Aus dem Hygienischen Institut der Landes-Universität Rostock

Kritische und experimentelle Beiträge

zur

Kenntnis der Gallenfarbstoffe

Inaugural-Dissertation

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Rostock

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Richard Köster

aus Schwerin i. M.

Rostock

Carl Hinstorffs Buchdruckerei

1901

Ref.: Herr Prof. Dr. Michaelis.

MEINEN LIEBEN ELTERN

IN DANKBARKEIT

GEWIDMET.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549202_0190

I.

Vorbemerkungen.

Unter den Körpern, welche wir als Produkte des tierischen Stoffwechsels kennen gelernt haben, haben die Farbstoffe stets ein besonderes Interesse erweckt. Trotzdem gehören sie noch heute, was ihre Zusammensetzung anbetrifft, zu den am wenigsten bekannten, was allerdings wohl nur dem Umstande zuzuschreiben ist, dass sie selten in solcher Menge zur Verfügung standen, als notwendig ist, ihre chemische Natur durch Analyse und synthetische Operationen festzustellen. Die meisten Forscher, welche sich mit der Untersuchung der Gallenfarbstoffe befassten, mussten sich daher darauf beschränken, nur die elementare Zusammensetzung derselben zu ermitteln und ihr Verhalten gegen Reagentien zu prüfen. Solche Prüfungen wurden zuerst und auch noch später nur vom Standpunkte der Verwertung der Reaktionen zu diagnostischen Zwecken ausgeführt, zumal das Auftreten der Gallenfarbstoffe in Organen, welche solche nicht producierten und beherbergten, ferner ihr Erscheinen in gewissen Ausscheidungen klinisch von grosser Bedeutung war. Später hat man allerdings die Reaktionen der Gallenfarbstoffe mehr systematisch geprüft und mit Hülfe

pathologischer Anhäufungen von Gallenfarbstoffen in Concrementen eine Isolierung der Gallenfarbstoffe versucht und teilweise auch erreicht. Immerhin ist aber die so gewonnene Erkenntnis noch nicht sehr gross, zumal auch die Befunde einiger Forscher bisher nicht in Einklang zu bringen waren. Es rechtfertigt sich daher wohl, wenn ich versuche, mit Hülfe eines allerdings auch nicht grossen Materials, das ich einer Sammlung des Herrn Professor Pfeiffer verdanke, die Kenntnis der chemischen Eigenart der Gallenfarbstoffe zu fördern. Vorher möchte ich aber noch kurz auf die in der Litteratur niedergelegten Erfahrungen über die Natur und die Reaktionen der Gallenfarbstoffe eingehen. Näher auf die Litteraturangaben zurückzugreifen, halte ich für überflüssig, da ich mich späterhin doch noch auf Einzelheiten der Angaben der Autoren beziehen werde.

Die ältesten Untersuchungen von Berzelius[1], Platner[2], Tiedemann und Gmelin[3], Schmid[4], Scherer[5], Hein[6], Heintz[7] und Virchow[8] haben ergeben, dass aus der Galle und den Concrementen der Gallenblase zwei Farbstoffe zu gewinnen waren, von denen der eine, von Berzelius als Biliverdin bezeichnete, einen grünen amorphen Körper darstellte, während der zweite, von brauner Farbe, von Berzelius in Gestalt

---

[1]) Pharm. Centralblatt 1840 S. 215;
[2]) „ „ 1844 S. 828;
[3]) Die Verdauung nach Versuchen. Heidelberg 1831, Bd. 1 S. 79;
[4]) Pharm. Centralblatt 1845 S. 596;
[5]) Annal. d. Chemie u. Pharm. Bd. 53 S. 377;
[6]) Journ. f. prakt. Chemie Bd. 40 S. 47;
[7]) Poggendorf's Annalen Bd. 84 S. 106;
[8]) Pharm. Centralblatt 1851 S. 944.

kleiner rotgelber Krystalle erhalten werden konnte, deren Lösung an der Luft aber bald in die des grünen Farbstoffes überging.

Mit den Farbstoffen konnten folgende Reaktionen vorgenommen werden. Alkohol löste beide, ebenso Alkalien. Durch Wasser konnten sie aus der ersteren, durch Säuren aus der andern Lösung wieder abgeschieden werden. Mit Salpetersäure gaben sie eine Anzahl auffallend schöner Färbungen (blau, violett, rot, gelb); diese Reaktion wird nach ihrem Entdecker als die Gmelinsche Gallenfarbstoffreaktion bezeichnet. Mit Oxyden der alkalischen Erden und den Schwermetallen gingen beide Farbstoffe in Wasser und Alkohol unlösliche Verbindungen ein.

Virchow hielt das zuerst von Heintz als Biliphäin benannte braune Produkt für identisch mit dem Hämatoidin, das ihm als ein Uebergangsprodukt des Blutfarbstroffes in den Gallenfarbstoff galt, und Heintz stellte zuerst für das Biliphäin und Bilirubin Formeln auf. Das Biliverdin ist nach ihm als ein Oxydationsprodukt des Biliphäins anzusehen.

Im Jahre 1859 erhielt Brücke[1] durch Ausschütteln von Galle mit Chloroform und Fällen der Chloroformlösung mit Alkohol das Biliphäin als rote Krystallmasse (Cholepyrrhin); dieselben Krystalle gewann sodann Maly[2] durch Extraktion von mit Säuren behandelten Gallensteinen und nannte den Körper zuerst Bilirubin. Wurde Bilirubin mit Essigsäure im zu-

[1]) Pharm. Centralblatt 1859 S. 248.
[2]) Liebig's Annalen 1864 Bd. 132 S. 127;
Wiener Sitzungsberichte Bd. 59 II S. 597.

geschmolzenen Rohr erhitzt, so bildete sich Biliverdin, wie Maly annahm unter Abspaltung von Ammoniak. Er erblickte in dem Bilirubin das Amid des Biliverdins, das er für eine Säure hielt. Auch glaubte er nachweisen zu können, dass Biliverdin durch Einwirkung von Ammoniak wieder in Bilirubin übergeführt werden könne. Diese Ansicht liess Maly[1] später wieder fallen und schloss sich in der Beurteilung der Beziehungen des Biliverdins zu dem Bilirubin Staedeler[2] an, der Bilirubin als amorphes orangerotes oder krystallinisches dunkelrotes aschefreies Pulver beschrieben hatte, das sich unlöslich in Alkohol, Aether, Schwefelkohlenstoff und Benzol, dagegen löslich in Chloroform, Essigsäure und Terpentinöl, besonders leicht löslich in verdünnten Laugen erwies.

Auf Grund der Elementaranalyse gab Staedeler dem Bilirubin die Formel $C_{32} H_{36} N_4 O_6$. Er fand weiter, dass sich die alkalischen Lösungen von Bilirubin beim Schütteln mit Luft grün färbten, durch Bildung von Biliverdin, welches er als Oxydationsprodukt des Bilirubins auffasste, und welchem er die Formel $C_{32} H_{40} N_4 O_{10}$ zuerteilte. Seine Entstehung veranschaulichte er durch folgende Gleichung:

$$C_{32} H_{36} N_4 O_6 + 2 H_2O + 2 O = C_{32} H_{40} N_4 O_{10}$$

Den bei der Behandlung mit Salpetersäure entstehenden blauen Farbstoff hielt Staedeler für ein dem Harnindigo nahe stehendes Produkt.

---

[1]) Chem. Centralblatt 1868 S. 487.
[2]) Liebig's Annalen Bd. 132 S. 323.

Am eingehendsten wurde das Bilirubin von Maly und Thudichum untersucht. Ersterer fand[1,3], dass das Bilirubin nur durch Sauerstoffaufnahme in Biliverdin übergeführt wurde; ferner beobachtete er, dass Bromzusatz zu einer Lösung von Bilirubin in Chloroform dieselben Farbenerscheinungen verursachte, wie sie bei der Gmelin'schen Probe beobachtet werden, und deutete die Wirkung des Broms als eine oxydierende[2]. Durch salpetrige Säure konnte er[1] das Bilirubin in einen Körper mit 55,23 % C und 30,39 % O umwandeln, den er Choletelin nannte, und in dem er das Endprodukt einer Reihe von Oxydationsprodukten des Bilirubins erblickte. Thudichum[4], der schon vor Maly die Eigenschaften des Bilirubins untersucht hatte, fand hingegen die durch Chlor oder Brom erhaltenen Farbstoffe Haloidhaltig und stellte deren Identität mit den durch salpetrige Säure hervorgerufenen Farbstoffen in Abrede. Er ermittelte für das Biliverdin die gleiche Zusammensetzung wie Maly, dachte sich dasselbe aber aus dem Bilirubin durch Oxydation eines Kohlenstoffatoms entstanden, weil er für das Bilirubin die Formel $C_9 H_9 NO_2$, für das Biliverdin diejenige $C_8 H_9 NO_2$ erhalten hatte. Thudichum[5] beschrieb eine Reihe von Metallverbindungen des Bilirubins, die nach seiner Ansicht die Richtigkeit der Formel $C_9 H_9 NO_2$ bestätigten, und ebenso auch die Zusammensetzung der durch Chlor- oder

---

[1]) Wiener Sitzungsberichte Bd. 57 II S. 95.
[2]) „ „ „ 59 S. 597.
[3]) Liebig's Annalen Bd. 175 S. 76.
[4]) Journal of the chemical Society [2] Bd. 13 S. 389.
[5]) Journal f. prakt. Chemie Bd. 104 S. 193.

Bromeinwirkung erhaltenen Produkte. Die Differenzen der Untersuchungen Thudichum's und Maly's[1] führten zu einem Meinungsaustausch beider, dessen Ergebnis wesentlich das war, dass Maly[2] auf Grund weiterer Prüfungen bestätigen konnte, dass der durch Haloide entstandene blaue Farbstoff thatsächlich Haloidhaltig sei. Durch Behandeln mit nascierendem Wasserstoff konnte er den blauen Farbstoff in Hydrobilirubin überführen, das er schon früher[3] durch Reduktion des Bilirubins gewonnen hatte, durch Alkalien erhielt er aus dem als Tribrombilirubin bezeichneten blauen Bromierungsprodukt durch Ersatz der drei Atome Brom durch drei Hydroxylgruppen Biliverdin, welchen Vorgang er durch nachstehende Formel erklärte:

$$C_{32}H_{36}N_4O_6 + 6\,Br = C_{32}H_{33}Br_3N_4O_6 + 3\,HBr$$

$$C_{32}H_{33}Br_3N_4O_6 + 3\,KOH = C_{32}H_{33}(OH)_3N_4O_6 + 3\,KBr$$

Durch diese Gleichungen glaubte Maly auch zu beweisen, dass die Molekularformel des Bilirubins $C_{32}H_{36}N_4O_6$ sei, während Thudichum nach wie vor an der Formel $C_9H_9NO_2$ festhielt.

Sieht man von den Untersuchungen von Heynsius und Campbell[4], Jaffé[5,6], Ritter[7], Stokvis[8]

---

[1]) Wiener Sitzungsberichte Bd. 72 S. 517.
[2]) Liebig's Annalen Bd. 181 S. 242.
Journal f. prakt. Chemie N.F. Bd. 53 S. 314.
[3]) Liebig's Annalen Bd. 161 S. 368, Bd. 163 S. 77.
[4]) Pflüger's Archiv Bd 4 S. 497.
[5]) Bulletin de la société chimique Janvier 1870.
[6]) Journal f. prakt. Chemie Bd. 104 S. 401.
[7]) Bulletin de la société chimique 1. semestre. Nouvelle série tome 13.
[8]) Berliner Berichte 1872 S. 583.

Simoni[1], Andouard[2,3], Disqué[4], Capranica[5,a b] Ehrlich[6], Mac Munn[7], Michailow[8], Krukenberg[9], Haycraft und Scofield[10], Jolles[11,12], Dastre und Floresco[13] und Clemens[14] ab, welche keine wesentliche Klärung der Widersprüche der Untersuchungsergebnisse Maly's und Thudichum's und auch nichts bemerkenswertes neues brachten, so bleibt schliesslich nur noch die Arbeit von Küster[15,16] zu erwähnen, welcher durch Oxydation des Biliverdins mit Natriumbichromat und Essigsäure eine Säure erhielt, die er als Biliverdinsäure bezeichnete und als Amid der Hämatinsäure erklärte. Küster hat auch dargethan, dass die Bildung von Biliverdin nicht so einfach erfolgt, wie nach den Angaben Maly's und Thudichum's anzunehmen war.

---

[1]) Wiener Sitzungsberichte Bd. 73 (3) S. 181.
[2]) Bulletin de la société chimique Bd. 1 S. 139 (1879).
[3]) Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. 2 S. 272.
[4]) Pflüger's Archiv Bd. 21 S. 176.
[5a]) Pflüger's Archiv Bd. 20 S. 331.
[5b]) Jahresbericht über d. Fortschritte d. Tierschemie 1882 S. 312.
[6]) Jahresbericht über d. Fortschritte d. Tierchemie 1885 S. 322.
[7]) Proceedings of the Royal society of London 1883 S. 153.
[8]) Bulletin de la société chimique [2] Bd. 42 S. 316, Bd. 43 S. 123.
[9]) Jahresbericht über d. Fortschritte d. Tierchemie 1887 S. 444.
[10]) Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrgang 24 S. 470.
[11]) Pflüger's Archiv Bd. 57I S. 1.
[12]) Journal f. prakt. Chemie N. F. Bd. 59 S. 308.
[13]) Chem. Centralblatt 1897 II S. 1055.
[14]) Arbeit z. Erlangung d. Venia legendi. Verlag Lippert u. Co. Naumburg a. S.
[15]) Berliner Berichte 1897 S. 1831.
[16]) Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. 26 S. 314.

Die Sachlage ist hiernach so, dass abgesehen von Thudichum alle Analytiker des Bilirubins die gleiche Elementarformel für dasselbe annehmen, dass alle in dem Biliverdin ein Oxydationsprodukt des Bilirubins anerkennen, dass aber dessen Zusammensetzung nicht feststeht; dass ferner die Produkte der Einwirkung der Haloide trotz gleicher äusserer Eigenschaften mit denjenigen der Einwirkung der salpetrigen Säure nicht identisch sind, sondern Haloidhaltig sind, endlich, dass reducierende Substanzen das Bilirubin in einen dem Harnfarbstoff gleichartigen Körper überführen, und dass starke Oxydationsmittel das Bilirubin in einen den Abbauprodukten des Blutfarbstoffes verwandten Körper (Biliverdinsäure) umwandeln. Ueber die chemische Constitution herrscht noch völliges Dunkel.

Angesichts dieser Sachlage hielt ich es für meine Aufgabe zunächst die Differenzen in den Anschauungen Thudichum's und der übrigen Analytiker über die Elementarformel des Bilirubins zu beseitigen, dann das Molekulargewicht des Bilirubins festzustellen und schliesslich zu versuchen, über die bei der Einwirkung der salpetrigen Säure und der Haloide auf Bilirubin entstehenden Körper Klarheit zu erreichen. Wenn ich auch den letzteren Versuch nicht als völlig gelungen bezeichnen kann, so hoffe ich doch durch meine Versuche über die Einwirkung reducierender Stoffe auf das Bilirubin wenigstens einen wertvollen Beitrag zur Förderung der Kenntnis der Constitution des Bilirubins beigebracht zu haben, mit dessen Hülfe Anderen, die in dem glücklichen Besitz von mehr Bilirubin sind, vielleicht eine Auflösung der empirischen Formel des Bilirubins gelingen wird.

II.

Experimentelle und kritische Untersuchungen.

1. Zusammensetzung und Molekulargrösse des Bilirubins.

Den Untersuchungen über die Zusammensetzung und Molekulargrösse des Bilirubins schicke ich eine kurze Schilderung der Darstellung und der Eigenschaften desselben voraus.

Zur Darstellung von reinem Bilirubin benutzte ich im Wesentlichen die von Maly angegebene Methode. Die grob zerkleinerten Gallensteine wurden nacheinander mit heissem Wasser, Alkohol und Äther erschöpft und dann längere Zeit mit wiederholt erneuter Salzsäure digeriert, um die Bilirubinkalk-Verbindung zu zerlegen. Beim Zusatz von Salzsäure zu dem grobpulvrigen Rückstand erfolgte ein lebhaftes Aufbrausen. Nach dem Auswaschen der Salzsäure wurde das so erhaltene rohe Bilirubin nochmals mit Äther und Alkohol extrahiert, um die letzten Reste der in diesen Mitteln löslichen Beimengungen zu entfernen, und endlich mit Chloroform aufgenommen. Die Extraktionen wurden im Soxhletschen Extraktionsapparat vorgenommen. Beim Ver-

dunsten des Chloroforms blieb das Bilirubin als trockenes braunrotes Pulver zurück, das beim Zerreiben den Farbenton des Goldschwefels annahm. Nach der Extraktion mit Chloroform blieb noch eine beträchtliche Menge rohen Bilirubins zurück, das auch bei tagelang fortgesetzter Extraktion mit Chloroform nur eine ganz geringe Menge von Bilirubin an dasselbe abgab. Erst nach wiederholtem Digerieren mit Salzsäure, Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther war es möglich, aus demselben mit Chloroform wieder reines Bilirubin in noch recht erheblichen Mengen zu gewinnen.

Die auf diese Weise gewonnenen Portionen Bilirubin wurden zur weiteren Reinigung abermals mit Chloroform aufgenommen und durch reichlichen Zusatz von Alkohol aus der Chloroformlösung wieder gefällt; nach dem Trocknen wurde es endlich aus Chloroform noch einmal umkrystallisiert. Es bildete nunmehr mikroskopische, gut ausgebildete rote Säulchen, die noch schöner durch Umkrystallisieren aus Dimethylanilin zu erhalten waren. Das Umkrystallisieren aus Anilin gab weniger günstige Resultate. Die von Küster als charakteristisch beschriebene Keulenform konnte ich nicht beobachten.[1] Die bei der Reinigungsfällung mit Alkohol erhaltene Alkohol-Chloroformmischung war grün gefärbt, sie enthielt Biliverdin, das sich wahrscheinlich bei den Extraktionen mit Chloroform gebildet hatte. Nach meinen Erfahrungen kann ich Maly nur beipflichten, wenn er sagt, dass Bilirubin nur dann als rein anzusehen ist, wenn es aus Chloroformlösung mit Alkohol gefällt ist.

[1]) Das nach einer mikrophotographischen Aufnahme hergestellte Bild zeigt aus Chloroformlösung erhaltene Bilirubinkrystalle.

Mein krystallisiertes Bilirubin erwies sich in Wasser völlig unlöslich, während Aether, Methylalkohol, Aethylalkohol, Amylalkohol, Benzol und Schwefelkohlenstoff dasselbe in geringer Menge mit schwach gelber Farbe lösten. Terpentinöl und fette Oele, wie Olivenöl und Ricinusöl lösten dasselbe nur wenig und mit rotbrauner Farbe; etwas leichter war es in Anilin löslich. In verhältnismässig grösserer Menge wurde es von Aethylenbromid und Phenol gelöst, doch waren zum Umkrystallisieren desselben nur Chloroform und Dimethylanilin brauchbar.

Ein Gramm Bilirubin brauchte 222 g heissen Chloroforms oder 434 g kalten Chloroforms zur Lösung. Dimethylanilin löste bei weitem mehr, konnte aber nur durch langwieriges Auswaschen mit Alkohol von den ausgeschiedenen Bilirubinkrystallen wieder entfernt werden. Essigsäure löste das Bilirubin ebenfalls leichter als Chloroform, die Lösung war braun, wurde aber schon nach kurzer Zeit beim Stehen an der Luft, noch schneller beim Erwärmen, grün. Schwefelsäure löste das Bilirubin gleichfalls mit brauner Farbe, aus der Lösung wurde es durch Wasser in braunen Flocken gefällt, die, ausgewaschen und getrocknet, sich als in Chloroform unlöslich erwiesen. In starker Salzsäure löste sich dasselbe nur nach längerem Kochen und auch dann nur zum kleinsten Teil mit schmutzig grüner Farbe, auf Zusatz von Wasser wurde ein grüner voluminöser Niederschlag abgeschieden.

Ammoniak löste das Bilirubin sehr leicht schon in grosser Verdünnung und in der Kälte mit rotbrauner

Farbe; die Lösung war sehr haltbar und wurde auch nach wochenlanger Aufbewahrung nicht grün, auch längeres Einleiten von reinem Sauerstoff bewirkte in der Farbe der Lösung keine Veränderung. Salzsäure fällte aus der ammoniakalischen Lösung braune Flocken, die sehr bald einen braungrünen Ton annahmen; das Filtrat von diesen war stets schwach grün gefärbt. Kalilauge und Natronlauge lösten Bilirubin nur in starker Verdünnung leicht; beim Stehen an der Luft wurden die rotbraunen Lösungen schon nach einem Tage schmutzig grün; durch Erhitzen wurde diese Farbenveränderung beschleunigt. Wurden die rotbraunen Lösungen längere Zeit in einer ganz gefüllten luftdicht verschlossenen Flasche aufbewahrt, so zeigte sie die gleiche Farbenveränderung. Einleiten von Luft oder reinem Sauerstoff wirkte aber scheinbar weder beschleunigend noch verstärkend auf die Farbenveränderung. Die rotbraunen Alkalilösungen mit überschüssigem concentriertem Alkali versetzt, schieden braune Flocken aus, die durch Zusatz von viel Wasser wieder in Lösung gebracht werden konnten. Salzsäure fällte aus denselben schmutzig grüne Flocken, die, gewaschen und getrocknet, ein sprödes glänzend schwarzes Produkt lieferten, das zum grössten Teil mit grüner Farbe in Alkohol löslich war. Kaliumkarbonat- und Natriumcarbonatlösungen verhielten sich ähnlich wie die Alkalilaugen, doch erfolgte ihre Einwirkung etwas langsamer.

Die alkalischen Lösungen wurden durch Bleisuperoxyd rasch tief grün gefärbt, doch ging die Farbe beim

längeren Stehen in braungrün über. Eine essigsaure Bilirubinlösung hingegen wurde durch Bleisuperoxyd über grün bis zu hellgelb verfärbt. Auf Zusatz von Wasser fiel aus dieser hellgelben Lösung ein flockiger blassgelber Niederschlag aus, der in Alkohol löslich war. Wasserstoffsuperoxyd erzeugte sowohl in der ammoniakalischen als auch in der essigsauren Bilirubinlösung eine hellgelbe Verfärbung, die unter lebhafter Gasentwickelung vor sich ging. Aehnlich wirkte Kaliumpermanganat auf Bilirubin in essigsaurer Lösung; in dem Filtrat war Kaliumcarbonat in beträchtlicher Menge enthalten, beim Eintrocknen der neutralisierten Lösung entwickelte sich ein intensiver Geruch nach Cumarin. Ein besonderes Verhalten zeigte das Bilirubin gegen Salpetersäure, der durch Zusatz von Harnstoff etwa vorhandene oder neugebildete salpetrige Säure entzogen wurde. Dieselbe löste das Bilirubin mit brauner Farbe, doch wurde diese Lösung allmählich immer heller, bis hellgelb, ohne die Gmelin'sche Farbenreaktion zu zeigen. Durch Uebersättigen mit Ammoniak entstand ein gelber Niederschlag, der in Wasser löslich war; Silbernitrat fällte aus dieser Lösung braune Flocken. Durch salpetrige Säure oder solche haltende Salpetersäure hingegen trat die unter dem Namen der Gmelin'schen Gallenfarbstoffprobe bekannte eigentümliche Farbenveränderung ein, im Verlauf deren die gelbe Farbe des Bilirubins in intensives Grün, reines Blau, Violett und schliesslich Rot überging. Bei weiterer Einwirkung der salpetrigen Säure verblasste das Rot zu einem rotgelben Farbenton, der nun blieb. Wenn von früheren Autoren bei dieser Behandlung eine vollständige Entfärbung der

Lösung beobachtet wurde, so ist das wohl darauf zurückzuführen, dass die Lösungen des rotgelben Produktes sehr verdünnte waren, so dass die rotgelbe Farbe nicht mehr wahrgenommen werden konnte. Dieselbe Farbenveränderung erfuhr das Bilirubin in Chloroformlösung bei der Einwirkung von Brom oder Jod. Auch bei dieser Einwirkung blieb schliesslich eine rotgelb gefärbte Lösung zurück, die, abgedampft, einen amorphen, braunroten in Alkohol löslichen Körper von aromatischem Geruch lieferte.

Alle diese Eigenschaften des Bilirubins sind schon längst bekannt; wenn ich sie hier noch besonders aufgeführt habe, so geschah das, um darzuthun, dass ich sicher kein von den bisher als reines Bilirubin bezeichneten abweichendes Präparat unter den Händen gehabt habe.

Die Elementaranalyse des Bilirubins ergab mir folgende Werte.

I. Bilirubinkrystalle aus Dimethylanilin.

1. 0,1912 g Bilirubin gaben 0,4715 g CO_2 = 67,26 % C
und 0,1119 g H_2O = 6,50 „ H
2. 0.2112 g Bilirubin gaben 0,5199 g CO_2 = 67,14 „ C
und 0,1229 g H_2O = 6,46 „ H
3. 0,1754 g Bilirubin gaben bei 766 mm Barometerstand
und 18,9° 15 ccm N = 9,82 % N
4. 0,1513 g Bilirubin gaben 0.0152 g N nach Kjeldahl
= 10,05 % N

II. Bilirubinkrystalle aus Chloroform.

1. 0,2316 g Bilirubin gaben 0,5695 g CO_2 = 67,05 % C
und 0,1323 g H_2O = 6,35 „ H

2. 0,1457 g Bilirubin gaben 0,3587 g CO_2 = 67,14 % C
und 0,0838 g H_2O = 6,38 „ H
3. 0,1929 g Bilirubin gaben bei 768,18 mm Barometerstand und 16,1° 16,5 ccm N = 10,07 % N
4. 0,1824 g Bilirubin gaben 0,0183 g N nach Kjeldahl = 10,03 % N.

Für die Bilirubinkrystalle aus Dimethylanilin ergiebt sich hiernach folgende Elementarzusammensetzung.

C 67,26 % und 67,14 % im Mittel 67,20 %
H 6,50 „ „ 6,46 „ „ „ 6,48 „
N 9,82 „ „ 10,05 „ „ „ 9,93 „

Für die aus Chloroform erhaltenen Krystalle ist die procentische Zusammensetzung gefunden worden zu

C 67,05 % und 67,14 % im Mittel 67,09 %
H 6,35 „ „ 6,38 „ „ „ 6,36 „
N 10,07 „ „ 10,03 „ „ „ 10,05 „

Der mittlere Gehalt des Bilirubins an C, H, N aus obigen vier Einzelwerten berechnet ist somit 67,15 % C, 6,42 % H, 9,99 % N.

Da sich das Bilirubin vollständig frei von Asche, Haloiden u. s. w. erwies, so berechnet sich aus dieser Zusammensetzung die Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$, wie folgende Gegenüberstellung der gefundenen und für obige Formel berechneten Werte zeigt.

Gefunden	Berechnet für $C_{16}H_{18}N_2O_3$
C 67,15 %	67,13 %
H 6,42 „	6,29 „
N 9,99 „	9,79 „
O 16,44 „	16,79 „
100,00 %	100,00 %

Mein Ergebnis stimmt völlig überein mit den Ergebnissen der Analysen von Staedeler, Maly und Küster, die nachstehende Elementarzusammensetzung für das Bilirubin ermittelten.

	Staedeler[1]	Maly[2]	Küster[3]
C	67,15 %	67,16 %	67,19 %
H	6,19 „	6,20 „	6,46 „
N	9,59 „		10,12 „
O	16,99 „		16,23 „

Hingegen weichen davon ab die Resultate der Analysen von Thudichum,[4] der für krystallisiertes Bilirubin folgenden prozentischen Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff fand.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	Mittel
C =	66,02	66,41	65,61	—	—	—	66,01 %
H =	5,98	6,13	5,95	—	—	—	6,01 „
N =	—	—	—	9,05	9,49	8,56	9,03 „
O =	—	—	—	—	—	—	18,95 „

Aus dieser Elementarzusammensetzung berechnete Thudichum die Formel des Bilirubins zu $C_9H_9NO_2$ und verglich die theoretischen und gefundenen Werte in folgender Tabelle.

Atom	Atomgewicht	Theorie in 100	Mittel d. Analyse
C 9	108	66,26 %	66,01 %
H 9	9	5,56 „	6,01 „
N 1	14	8,59 „	9,03 „
O 2	32	19,63 „	18,95 „
	163	100,00 %	100,00 %

[1]) Liebigs Annalen Bd. 132 S. 323.
[2]) Journal f. pract. Chemie. Bd. 104, 1868 S. 30.
[3]) Berliner Berichte 1897 S. 1831.
[4]) Journal f. pract. Chemie. Bd. 104. 1868 S. 200.

Es ist nun höchst merkwürdig, dass alle Analytiker ausser Thudichum für das Bilirubin eine der Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ entsprechende Zusammensetzung gefunden haben.

Thudichum hingegen erwies sich das Bilirubin als Kohlenstoff- und Sauerstoffreicher und zwar, für gleichen Stickstoffgehalt berechnet, um reicher an zwei Atomen Kohlenstoff und einem Atom Sauerstoff.

Noch merkwürdiger aber ist, dass Thudichum's Biliverdin $C_5H_5NO_2$ in seiner Elementaranalyse vollständig übereinstimmt mit dem von Maly analysierten Biliverdin $C_{16}H_{18}N_2O_4$. Thudichum erklärte dieses auffällige Verhalten dadurch, dass er annahm, dass bei der Bildung von Biliverdin aus Bilirubin durch Oxydation ein Atom Kohlenstoff in Form von Kohlensäure abgespalten würde, ein Vorgang, den er aber weder selbst noch andere analytisch belegen konnten. Auch ich konnte bei der Biliverdinbildung keine Kohlensäureabspaltung beobachten.

Ich habe mir deshalb die Originalbelege Thudichum's[1] genau angesehen und gefunden, dass, wenn man ein anderes als das von ihm gezogene Mittel zieht, sich auch eine andere Formel ergiebt, und die Uebereinstimmung der Theorie und Praxis eine viel grössere wird, als diejenige der von Thudichum für seine Formel berechneten und analytisch gefundenen Werte ist. Das Ziehen eines anderen Mittels halte ich aber aus folgenden Gründen für berechtigt. Zu Analyse III, welche einen erheblich niedrigeren Wert für Kohlenstoff

[1]) Journal f. pract. Chemie. 1868. Bd. 104, S. 200.

ergab (65,61 gegen 66,02 % und 66,41 % in I und II) bemerkt Thudichum „Die zu dieser Analyse verwandte Verbrennungsröhre war ein wenig zu klein"; folglich konnte ein Fehler in der Analyse vorliegen und musste der erhaltene Wert unberücksichtigt bleiben. In Analyse VI (Stickstoffbestimmung) sagt Thudichum weiter: „0,4925 g wurden mit Natronkalk verbrannt. Die Operation hinterliess 0,3065 g Platin gleich 8,82 % Stickstoff. In dieser Analyse erschien eine ungewöhnliche Menge flüchtigen Kohlenwasserstoffes. Nimmt man das krystallisierte Platinsalz, welches vom Filterpapier abgeschabt wurde, allein in Rechnung und lässt eine äusserst geringe Menge Platin, welche am Papier hing, ausser Betracht, als wahrscheinlich nur mit oxydiertem Kohlenwasserstoff verbunden, so erhält man für Stickstoff 8,3 %, oder das Mittel der beiden Bestimmungen ist 8,56 %."

Diesen Wert setzt Thudichum für die Berechnung des mittleren Wertes mit ein. Nun weicht derselbe aber von den beiden übrigen Werten 9,05 % und 9,49 % um 0,5 % bezw. 0,93 % ab. Da also die Stickstoffbestimmung nach obigen eigenen Worten Thudichums nicht ganz gewöhnlich verlief, so kann der bei derselben erhaltene Wert nicht als einwandfrei bezeichnet werden. Lässt man für das Mittel die Werte der Analysen III und VI ausser Betracht, so ergiebt sich für Thudichum's Bilirubin folgende mittlere Zusammensetzung

C =	66,02 %	und	66,41 %	=	66,21 %
H =	5,98 „	„	6,13 „	=	6,05 „
N =	9,05 „	„	9,49 „	=	9,27 „
O =					18,47 „

Dieses Mittel entspricht aber der Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ mindestens ebenso gut als der Thudichum'schen Formel $C_9H_9NO_2$, wie nachstehender Vergleich zeigt.

Gefunden	Berechnet für $C_9H_9NO_2$	Differenz	Berechnet für $C_{16}H_{18}N_2O_3$	Differenz
C 66,21	66,26	— 0,05	67,13	— 0,92 %
H 6,05	5,52	+ 0,53	6,29	— 0,24 „
N 9,27	8,59	+ 0,68	9,79	— 0,52 „
O 18,47	19,63	— 1,16	16,79	+ 1,68 „

Bei Annahme der Maly'schen Formel ist nur der Sauerstoffgehalt zu hoch bestimmt. Wie aber, wenn Thudichum kein ganz reines, biliverdinfreies Bilirubin besass? Dass solches sehr leicht vorkommen kann, ist durch Maly's und Küster's Angaben sehr wahrscheinlich gemacht. Ein 5 % Biliverdin haltendes Bilirubin müsste einen Kohlenstoffgehalt von 65,99 %, eines mit 10 % solchen von 66,12 % besitzen.

Später werde ich darauf, dass die Thudichum'sche Formel nicht einwandfrei ist, noch zurückkommen, möchte jetzt aber zunächst zur Bestimmung der Molekulargrösse des Bilirubins übergehen.

Eine Zeit lang galt die Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ schon als Molekularformel, bis Maly[1] auf Grund der Zusammensetzung seines Hydrobilirubins, Tribrombilirubins und der Umwandlung des letzteren in Biliverdin durch Einwirkung von Alkalien eine Verdoppelung dieser Formel für nötig erachtete, welcher Ansicht sich Nencki und Sieber[2] auf Grund der Verwandtschaft des Bilirubins mit dem Hydrobilirubin und Hämatin anschlossen.

---

[1]) Annalen d. Chem. u. Pharm. 1876 Bd. 181 S. 106 u. folg.
[2]) Berliner Berichte 1884 Bd. 17 S. 2267 u. f.

Eine direkte Molekularbestimmung des Bilirubins finde ich in der Litteratur nicht verzeichnet. Thudichum benutzte die Eigenschaft des Bilirubins, sich mit Basen zu verbinden, zur Ermittelung der Molekulargrösse des Bilirubins. Er stellte auch eine grössere Anzahl von Bilirubinmetallverbindungen dar, und lässt deren Beständigkeit und Zerlegbarkeit durch Säuren keinen Zweifel, dass es sich um Salzbildungen handelte; daher darf das Bilirubin wohl als Säure angesehen werden.

Thudichum beschrieb ein Ammoniak-, Kalium- und Natriumsalz, für die er Formeln jedoch nicht aufstellte; seine Silber-, Barium-, Calcium-, Zink- und Bleisalze hatten folgende Formeln.

$C_9H_8AgNO_2 + H_2O$	Neutrales einfach gewässertes	Bilirubin-Silber
$C_9H_7Ag_2NO_2$	Basisches wasserfreies	„ „
$C_{18}H_{16}BaN_2O_4 + 2H_2O$	Neutrales gewässertes	„ Barium
$C_{27}H_{25}BaN_3O_6 + 2H_2O$	Halbsaures „	„ „
$C_{18}H_{16}CaN_2O_4 + 2H_2O$	Neutrales „	„ Calcium
$C_{27}H_{25}CaN_3O_6 + 2H_2O$	Halbsaures „	„ „
$C_{27}H_{25}ZnN_3O_6 + 2H_2O$	„ „	„ Zink
$C_9H_7PbNO_2$	Basisches wasserfreies	„ Blei

Staedeler hatte schon früher ein Calciumsalz des Bilirubins dargestellt, welches 6,5 % Calcium enthielt und welchem er die Formel $C_{32}H_{34}CaN_4O_6$ gab. Thudichum hielt dieses Salz für das „Halbsaure".

Nachdem mir ein Versuch, das Molekulargewicht des Bilirubins mittelst der Raoult'schen Methode zu bestimmen, infolge der geringen Löslichkeit des Bilirubins in Eisessig und daraus resultierender zu geringer Depression des Gefrierpunktes fehlgeschlagen war, habe ich versucht, dasselbe aus der Calciumverbindung zu ermitteln.

Die Darstellung des Bilirubin-Calciums geschah in der Weise, dass eine schwach ammoniakalische, sehr verdünnte, kalte Lösung von Bilirubin mit wässriger Chlorcalciumlösung vorsichtig versetzt wurde, bis ein bleibender Niederschlag entstand. Derselbe, aus dunkelbraunen Flocken bestehend, wurde rasch abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen, wobei nur die ersten beiden Waschflüssigkeiten schwach gelb gefärbt waren, und im Vakuumexsikkator getrocknet. Eine Probe des Filtrates der Chlorcalciumfällung besass nur einen ganz geringen Gehalt an überschüssigem Chlorcalcium, das ganze Filtrat setzte auch nach Stunden noch keinen kohlensauren Kalk ab.

Getrocknet bildete das Bilirubincalcium eine das Licht grün reflektierende spröde Masse, welche zerrieben ein braunes sehr hygroskopisches Pulver ergab. Die Elementaranalyse (Verbrennung mit Bleichromat, Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl) von zwei verschiedenen Präparaten ergaben folgende Werte.

1. 0,3684 g Substanz gaben 0,8354 g CO_2 = 61,84% C und 0,1920 g H_2O = 5,79% H
2. 0,3042 g Substanz gaben 0,6948 g CO_2 = 62,29% C und 0,1593 g H_2O = 5,82% H
3. 0,2867 g Substanz gaben 0,6588 g CO_2 = 62,68% C und 0,1487 g H_2O = 5,76% H
4. 0,2113 g Substanz gaben 0,01779 g N = 8,42 „ N
5. 0,2066 g „ „ 0,01824 g N = 8,83 „ N
6. 0,2452 g „ „ 0,02154 g N = 8,79 „ N
7. 0,2322 g „ „ 0,0224 g CaO = 6,89 „ Ca
8. 0,2301 g „ „ 0,0218 g CaO = 6,77 „ Ca
9. 0,1940 g „ „ 0,0180 g CaO = 6,62 „ Ca

Die Elementarzusammensetzung des Bilirubincalciums ist sonach

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Mittel	berechnet für $(C_{16}H_{17}N_2O_3)_2Ca$
C	61,84	61,29	62,68							62,27	62,95 %
H	5,79	5,82	5,76							5,79	5,57 „
N				8,42	8,83	8,79				8,68	9,18 „
Ca							6,89	6,77	6,62	6,76	6,56 „
O										16,50	15,74 „
										100,00	100,00 %

Das Bilirubincalcium ist durch stärkere Säuren leicht zerlegbar in Bilirubin und das Calciumsalz der betreffenden Säure, und da dasselbe sonst sehr beständig ist, darf man die Verbindung wohl als ein Salz ansprechen. Es sind demnach zwei Moleküle Bilirubin mit einem Atom Calcium verbunden $(C_{16}H_{17}N_2O_3)_2Ca$.

Das Bilirubin ist also eine einbasische Säure und besitzt das Molekulargewicht 286 = $(C_{16}H_{18}N_2O_3)$. Würde es das doppelte Molekulargewicht haben (entsprechend der Formel $C_{32}H_{36}N_4O_6$), wie Maly annimmt, so müsste es nach obiger Zusammensetzung des Calciumsalzes eine zweibasische Säure sein, also auch saure Salze bilden. Letztere darzustellen, ist aber Niemandem gelungen, denn die sauren Salze Thudichum's sind keine sauren, sondern normale Salze, wie folgende Berechnungen ergeben. In seinem halbsauren Baryumsalz fand Thudichum 20,66 und 20,60 % im Mittel 20,63 % Barium, das normale Bariumsalz verlangt 19,37 %; in seinem halbsauren Calciumsalz fand er 7,03 und 6,79 % Ca im Mittel 6,91 % Calcium, das normale Calciumsalz verlangt 6,56 %; im halbsauren

Zinksalz endlich fand er[1] 11,30 %, die Theorie verlangt 10,24 % Zink. Dass die Prozentzahlen für Barium, Calcium und Zink in den Salzen von Thudichum etwas höher gefunden wurden als die Berechnung für ein normales Salz von der Formel $C_{32}H_{34}N_4O_6R$ verlangt, ist nichts auffälliges, wenn man bedenkt, wie leicht bei Anwendung überschüssigen Metallchlorides zur Fällung der ammoniakalischen Bilirubinlösung durch die stets ziemlich langsame Filtration etwas Carbonat entstehen und sich dem Bilirubinsalz beimengen kann, (ich habe selbst in zwei Fällen im Bilirubincalcium einen Gehalt von 7,03 und 7,11 % Calcium gefunden) und weiter, wenn ich mitteile, dass je nach der Art der Darstellung des Bilirubincalciums ein ganz verschiedenes Präparat resultieren kann. Das oben geschilderte normale Calciumsalz erhält man nur, wenn man kalt fällt; fällt man eine heisse ammoniakalische Bilirubinlösung mit Chlorcalcium, so erhält man viel Calciumreichere Bilirubincalcium-Verbindungen.

Folgende Zahlen mögen als Beleg dienen. Aus einer eben heiss gewordenen ammoniakalischen Bilirubin-Lösung fiel mit Chlorcalcium ein Niederschlag, der äusserlich kaum verschieden von dem bei kalter Fällung erhaltenen war, nur lieferte er beim Zerreiben ein ein etwas helleres Pulver; die Analyse desselben ergab folgende Werte:

1. 0,1950 g Substanz gaben 0,3879 g CO_2 = 54,26 % C und 0,1462 g H_2O = 8,33 % H.

[1]) Eine andere Zinkbestimmung, welche, wie Thudichum sagt, nicht regelmässig verlief, ergab 12,03 %.

2. 0,2004 g Substanz gaben (nach Kjeldahl) 0,0174 g N = 8,68 % N.

3. 0,1990 g Substanz gaben 0,0372 g CaO = 13,35 % Ca.

Hieraus berechnet sich die Formel

$C_{27} H_{50} N_4 O_6 Ca_2$.

Eine zur Verjagung des überschüssigen Ammoniaks längere Zeit auf dem Wasserbade erhitzte und sodann mit Chlorcalciumlösung gefällte ammoniakalische Bilirubinlösung, gab ein tiefbraunes Produkt, das beim Zerreiben dunkelbraun wurde und folgende Elementarzusammensetzung hatte:

1. 0,2914 g Substanz gaben 0,5638 g CO_2 = 52,76 % C und 0,1518 g H_2O = 5,79 % H.

2. 0,2844 g Substanz gaben (nach Kjeldahl) 0,02212 g N = 7,78 % N.

3. 0,2236 g Substanz gaben 0,0318 g CaO = 10,16 % Ca.

Die Formel dieses Körpers ist sonach

$C_{14} H_{23} N_4 O_6 Ca$.

Offenbar wurde beim Erhitzen der ammoniakalischen Bilirubinlösung ein Teil des Bilirubins verändert, was sich auch dadurch zu erkennen gab, dass, während nach der kalten Fällung mit Chlorcalcium das Filtrat rein gelb war, es nunmehr grünlich, ja dunkelgrün war.

Dieselbe Färbung des Filtrates hat auch Thudichum beobachtet und hebt er die Erscheinung bei der Beschreibung der Gewinnung des neutralen Baryumsalzes ausdrücklich hervor. In seinem neutralen Calciumsalz fand er genau soviel Calcium 10,17 %, als ich bei dem zweiten, heiss gefällten Präparat gefunden habe.

Thudichum hat nun in keinem Falle die Analyse seiner Bilirubinsalze vollständig durchgeführt; häufig hat er nur den Gehalt derselben an Metallen bestimmt; hätte er überall den Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff bestimmt, so hätte er darauf kommen müssen, dass die von ihm für das Bilirubin aufgestellte Formel nicht zutreffend sein kann. Ich wähle als Beispiel das von ihm beschriebene halbsaure Baryumsalz; dasselbe enthielt 50,63 % C, 4,37 % H und 20,63 % Ba. Daraus berechnet sich die Formel $C_{28}H_{29}Ba$, während Thudichum daraus die Formel ableitet $C_{27}H_{29}Ba$; für diese Formel ist aber der Kohlenstoffgehalt um 1,5 % zu hoch gefunden. Bei dem halbsauren Calciumsalz fand er 60,37 % C, 5,74 % H, 6,91 % Ca; die Formel ist hiernach $C_{29}H_{33}Ca$, der Kohlenstoffgehalt wurde hier um 2,8 % höher gefunden, als die Thudichum'sche Formel $C_{27}H_{29}CaN_3O_8$ verlangte. In seinem basischen Bleisalz ist der Bleigehalt im Mittel zu 58,14 %, fast 2 % höher als die Thudichum'sche Formel verlangt, bestimmt worden.

Ein solcher höherer Metallgehalt kann die ganze Formel umstimmen, wie ich selbst erfahren habe. Der Calciumgehalt eines meiner Bilirubincalciumsalze war, wie schon oben erwähnt, 7,03 % und 7,11 % Ca, im Mittel also 7,07 % Ca; die Formel verlangt 6,56 %. Der Gehalt an Kohlenstoff war zu 61,84 % und der an Wasserstoff zu 5,79 % bestimmt worden; daraus ergab sich die Formel $C_{29}H_{33}Ca$, während ich nach der Theorie $C_{32}H_{34}Ca$ erwarten musste. Dieser Befund hat mich zunächst auch stutzig gemacht; ich dachte an einen Kohlen-

stoffverlust des Bilirubins, wie ihn Thudichum bei der Bildung des Biliverdins angenommen hatte. Wäre aber ein solcher erfolgt, dann hätte ich bei der Zerlegung des Salzes kein reines Bilirubin mehr erhalten können; die Prüfung ergab aber, dass durch Salzsäure vollkommen reines Bilirubin wieder abgeschieden wurde. Die Untersuchung des sorgfältiger und in der Kälte gefällten Bilirubincalciumsalzes führte auf die richtige oben mitgeteilte Formel.

Hiermit glaube ich diesen Abschnitt meiner Arbeit beschliessen zu können. Ich habe wohl genügend dargethan, dass die Thudichum'sche Formel für das Bilirubin nicht einwandfrei ist und meine, dass kein Grund vorliegt, sie bei der Beschreibung des Bilirubins in den Hand- und Lehrbüchern der physiologischen Chemie noch weiter aufzuführen.

Auf Grund meiner Untersuchungen beanspruche ich für das Bilirubin die Formel: $C_{16}H_{18}N_2O_3$, das Molekulargewicht „286“, und den Charakter einer einbasischen Säure.

2. Wirkung von Oxydationsmitteln auf das Bilirubin.

Bereits unter dem Einflusse des Luftsauerstoffes erfährt das Bilirubin eine Veränderung, die allgemein als Oxydation bezeichnet wird. Das Bilirubin wird hierbei in einen amorphen, in Wasser und Chloroform unlöslichen, dagegen in Alkohol leicht löslichen Körper, das Biliverdin, umgewandelt. Die Umwandlung in Biliverdin vollzieht sich, wie es scheint, in jeder Wasserhaltigen Lösung des Bilirubins, besonders leicht und

rasch aber in alkalischer und essigsaurer Lösung. Durch Oxydationsmittel, wie Bleisuperoxyd, salpetrige Säure, Salpetersäure, Chromsäure, Haloide und deren Oxysäuren, erfolgt die Bildung von Biliverdin, wenn man unter Biliverdin ganz allgemein den grünen Alkohol-löslichen Farbstoff versteht, fast momentan; es ist bei Anwendung dieser Oxydationsmittel sogar grosse Vorsicht geboten, da sonst leicht weitere Veränderungen des Bilirubins erfolgen können.

Am eingehendsten haben sich mit der Darstellung und Untersuchung des Biliverdins Maly und Thudichum beschäftigt; letzterer glaubte schon 1861 nachgewiesen zu haben, dass Biliverdin weder ein Oxyd noch Hydrat oder gar Oxydhydrat (Staedeler) des Bilirubins sei. Er fand in einem durch Stehen einer alkalischen Lösung von Bilirubin an der Luft gebildeten und durch Salzsäure aus dieser Lösung gefällten Biliverdin im Mittel

62,43 % C, 6,13 % H, 9,34 % N, 22,10 % O

und leitete daraus die Formel $C_8 H_9 NO_2$ ab. Nach dieser Formel enthielt das Biliverdin um ein Atom Kohlenstoff weniger als sein Bilirubin, und erklärte Thudichum diesen Verlust an Kohlenstoff in der schon oben erwähnten Weise durch Abspaltung von einem Atom Kohlenstoff in Form von Kohlensäure.

$$C_9 H_9 NO_2 + 2 O = C_8 H_9 NO_2 + CO_2.$$

An dieser Erklärung habe ich Seite 21 schon Kritik geübt.

Dieselbe Zusammensetzung und Formel, wie Thudichum, fand auch Maly für das in gleicher Weise

von ihm dargestellte Biliverdin, nur hielt er mit Rücksicht auf die Zusammensetzung des Bilirubins eine Verdoppelung der Formel für notwendig ($C_{16}H_{18}N_2O_4$).

Hiernach würde sich das Biliverdin vom Bilirubin nur durch ein Mehr von einem Atom Sauerstoff unterscheiden, und müsste es daher als ein einfaches Oxydationsprodukt des Bilirubins angesehen werden. Uebrigens glaubte Maly auch eine Gewichtszunahme bei der Oxydation des Bilirubins zu Biliverdin festgestellt zu haben.

Maly hat ausserdem Biliverdin auch durch Erhitzen eines von ihm dargestellten Tribrombilirubins $C_{32}H_{33}Br_3N_4O_6$ mit Alkali gewonnen, jedoch enthielt dieses Biliverdin noch eine Spur Brom und hatte eine Zusammensetzung 63,96 % C, 5,52 % H, 9,49 % N, die besser auf die Formel $C_{16}H_{18}N_2O_4$ als auf die von Maly angenommene $C_{32}H_{33}(OH)_3N_4O_6$ passt, nach welcher das Molekulargewicht des Bilirubins nochmals verdoppelt werden müsste.

Küster[1] hat nach Angaben Maly's durch Oxydation des Bilirubins in alkalischer Lösung mit Bleisuperoxyd Biliverdin dargestellt; er fand für sein Präparat folgende Elementarzusammensetzung

65,57 % C 6,27 % H, 9,45 % N, 18,71 % O.

Diese stimmt noch am besten auf einen Körper von der Formel $(C_{16}H_{18}N_2O_3)_2O$.

Hiernach scheint es, dass es kein einheitliches Biliverdin giebt, und auch ich gewann bei Versuchen

[1]) Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. 26 S. 314.

aus Bilirubin Biliverdin darzustellen, den Eindruck, dass Biliverdin kein einheitlicher Körper sei. Leider reichte mir das Material zur Darstellung und Analyse des Biliverdins nicht aus.

Möglicherweise ist Biliverdin aber doch ein Körper, in welchem zwei Moleküle Bilirubin durch ein Atom Sauerstoff verbunden sind; vielleicht ist es ein Anhydrid des Bilirubins. Hierfür, scheint mir, spricht der Umstand, dass Biliverdin keine Salze bildet, was es doch thun müsste, wenn es eine einfache Oxysäure wäre.

Versucht man Biliverdin weiter zu oxydieren, so erhält man ganz verschiedene Resultate, je nachdem man die einen oder die andern Oxydationsmittel anwendet. Mit Bleisuperoxyd behandelt, färbt sich eine alkalische Biliverdinlösung braungrün und wird durch Säuren nicht mehr vollständig gefällt. Ich selbst konnte bei Behandlung einer Lösung von Bilirubin in Essigsäure mit Bleisuperoxyd einen Farbenumschlag der rotgelben Lösung nach grün, braungrün und hellgelb beobachten. Wird Bilirubin mit von salpetriger Säure befreiter Salpetersäure behandelt, so wird die braune Lösung, wie schon oben angeführt, allmählich immer heller bis schliesslich hellgelb. Ganz anders verläuft aber die Reaktion mit salpetriger Säure und mit Haloiden. Hier treten zunächst die prachtvollen Farbenstufen auf, die man von der Gmelin'schen Probe her genugsam kennt, bis sich schliesslich in beiden Fällen eine nur mehr schwach gelbe oder rotgelbe Lösung eines Körpers bildet, der trocken eine hellgelbe geruchlose oder, durch Haloide erhalten, eine aromatisch riechende, braunrote, nicht

krystallisierende Masse darstellt, die, zerrieben, ein hellgelbes Pulver liefert. Wird endlich Biliverdin mit Eisessig und Natriumbichromat längere Zeit gekocht, so bildet sich unter Abspaltung von Kohlensäure und Ammoniak ein krystallisierbarer Körper von der Formel $C_8H_9NO_4$ der ausgesprochenen Säurecharakter besitzt, die Biliverdinsäure Küster's.[1]

Nach dieser übersichtlichen Darstellung der bis jetzt bekannten Wirkungen der Oxydationsmittel auf Bilirubin bezw. Biliverdin im Allgemeinen, möchte ich auf einige besondere Erscheinungen dieser Einwirkungen näher eingehen.

Von einer Verfolgung der durch Bleisuperoxyd und salpetriger Säure-freier Salpetersäure hervorgerufenen Erscheinungen musste ich leider aus Mangel an genügendem Material absehen; hingegen gelang es mir durch Einwirkung von Kaliumnitritlösung auf essigsaure Bilirubinlösung das vorstehend erwähnte amorphe, gelbe Produkt zu erhalten. Das eingeschlagene Verfahren, das zunächst dazu dienen sollte, nachzuweisen, ob im Bilirubin eine Amidogruppe vorhanden ist, war folgendes:

Eine kleine Probe Bilirubin wurde in einem langhalsigen Kolben mit Eisessig übergossen, wobei eine tiefgelbe Lösung eines Teils des Bilirubins entstand. Die Mündung des Kolbens wurde mit einem dreifach durchbohrten Stopfen verschlossen. Die eine Bohrung nahm eine Trichterröhre mit Tropfvorrichtung auf; durch die beiden anderen Bohrungen wurden gebogene Glas-

[1]) Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. 26 S. 314 u. f.

röhren geführt, von denen eine mit einem Kohlensäureapparat, die andere mit einer Gasburette verbunden war. Als Sperrflüssigkeit für die Gasburette diente 30 %ige ausgekochte Natronlauge. Der Kohlensäurestrom wurde aus Natriumbicarbonat entwickelt und mit Schwefelsäure getrocknet. In der Trichterröhre war eine 1 %ige Kaliumnitritlösung; letztere liess ich erst zufliessen, als alle Luft aus dem Apparat verdrängt war. Zu Anfang des Kaliumnitritzusatzes wurde der Kolben gekühlt, zu Ende etwas erwärmt.

Sofort nach dem Zusatz der ersten Tropfen Kaliumnitritlösung ging die gelbe Farbe des Bilirubins in grün über, rasch folgte bei weiterem Zusatz dann die blaue und violette Färbung, dann schlug, aber erst ganz allmählich, die violette Farbe in rot und braun um. Die anfangs ziemlich heftige Gasentwickelung wurde allmählich schwächer. Mit dem Zusatz von Nitritlösung wurde fortgefahren, bis die Gasentwickelung aufhörte.

0,7700 g Bilirubin gaben bei 760,6 Barometerstand und 14,5° = 76,3 ccm N, welche, auf 760 Barometerstand und 0° und auf ein Gramm Bilirubin berechnet, 97 ccm N gleichkommen, während 78 ccm N einer Amidogruppe im Bilirubin entsprechen würden.

Bei einem wiederholten Versuche wurde nicht der entwickelte Stickstoff, sondern die verbrauchten Kubikcentimeter 1 %iger Nitritlösung gemessen. Der Zusatz der Nitritlösung wurde beendet, als freie salpetrige Säure durch Jodkaliumstärkepapier in dem Reaktionsgemisch nachgewiesen werden konnte. Verbraucht wurden für ein Gramm Bilirubin 128 ccm der Nitrit-

lösung, während für eine Amidogruppe der Berechnung nach nur 24,1 ccm Nitritlösung nötig gewesen wären, um dieselbe durch die Hydroxylgruppe zu ersetzen.

Hiernach kann also der Vorgang bei der Behandlung des Bilirubins mit salpetriger Säure nicht ein einfacher Ersatz einer Amidogruppe durch Hydroxyl gewesen sein, sondern muss als Oxydationsvorgang gedeutet werden.

Im Kolben blieb eine gelbbraune, klare Lösung zurück, die zunächst durch Erhitzen im Vakuum von der Hauptmasse der Essigsäure befreit und dann zur Trockne verdampft wurde. Durch Extraktion mit heissem Alkohol wurde der Trockensubstanz das essigsaure Natrium entzogen. Der schwarzbraune Rückstand war leicht in Wasser löslich, aus seiner wässrigen Lösung schied verdünnte Salzsäure gelbe Flocken ab, die, getrocknet, ein hellgelbes Pulver gaben, das löslich in Alkohol, unlöslich in Wasser, Aether, Petroläther, Chloroform und Benzol war. Versuche, es krystallinisch zu erhalten, misslangen.

Bei der Elementaranalyse der in zwei Versuchen erhaltenen Produkte gaben

1. 0,2450 g Substanz 0,4940 g CO_2 = 54,98% C
   und 0,1030 g H_2O = 4,67 „ H
2. 0,2182 g Substanz 0,4407 g CO_2 = 55,01 „ C
   und 0,0912 g H_2O = 4,64 „ H
1. 0,3765 g Substanz 0,0263 g N = 6,99 „ N
2. 0,2912 g Substanz 0,0205 g N = 7,04 „ N

	I	II	Mittel	Berechnet für $C_9H_9NO_4$
C	54,98	55,01	54,99	55,38 %
H	4,67	4,64	4,65	4,62 „
N	6,99	7,04	7,01	7,18 „
O	33,36	33,31	33,33	32,82 „

Das Bilirubin hat die Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$, folglich hat es bei der Behandlung mit salpetriger Säure verloren: sieben Atome Kohlenstoff, neun Atome Wasserstoff, ein Atom Stickstoff, und aufgenommen: ein Atom Sauerstoff.

Der vorstehend seiner Zusammensetzung nach mitgeteilte Körper giebt mit Metallsalzen flockige Niederschläge, scheint also Säurecharakter zu besitzen. Näheres über die Zusammensetzung desselben konnte ich leider nicht ermitteln, da ich zu wenig von dem Körper erhalten hatte und das wenige für die Elementaranalyse verwenden musste.

Einen ähnlichen Körper hat übrigens Maly bei der Oxydation des Bilirubins mit Brom und salpetriger Säure erhalten. Er hat denselben Choletelin genannt und schildert seine Eigenschaften ebenso, wie ich sie festgestellt habe. Die mittlere Zusammensetzung desselben war:

55,54 % C, 5,47 % H, 9,08 % N, 29,91 % O,

welche Werte der Formel $C_7H_8NO_3$ entsprechen. Doch weicht diese Formel erheblich von der von mir für das Endprodukt der Einwirkung der salpetrigen Säure auf Bilirubin erhaltenen Formel $C_9H_9NO_4$ ab.

Mit der Küster'schen Biliverdinsäure kann das von mir durch salpetrige Säure dargestellte Präparat nicht identisch sein; denn einmal ist die Biliverdinsäure,

wenn auch sonst meinem Präparät sehr ähnlich zusammengesetzt, ($C_8 H_9 NO_4$ gegen $C_9 H_9 NO_4$) doch ärmer an Kohlenstoff, ferner in Aether löslich und krystallisierbar, während mein Präparat amorph und unlöslich in Aether war. Endlich spaltet die Biliverdinsäure beim Kochen mit Natronlauge ein Molekül Ammoniak ab und liefert eine stickstofffreie Substanz, die Küster für das Lakton der dreibasischen Hämatinsäure hält. Derselbe Autor hat gefunden, dass schon bei der Spaltung des Bilirubins die Hämatinsäure gebildet wird.

Dieser Befund in Gegenüberstellung zu meinen Beobachtungen über das Endprodukt der Einwirkung der salpetrigen Säure auf Bilirubin, sowie die Angabe von Küster, dass er neben der Biliverdinsäure bei der Oxydation des Biliverdins mit Natriumbichromat noch einen Körper gefunden hat, welcher in Aether unlöslich war, und welcher in fast doppelt so grosser Menge als die Biliverdinsäure erhalten, jedoch noch nicht näher untersucht wurde, legt die Vermutung nahe, dass im Bilirubin zwei Kerne enthalten sind, von denen der eine die Biliverdinsäure, der andere mein etwas kohlenstoffreicheres Präparat bildet. Welcher Art die Kerne sein können, werde ich hernach bei der Schilderung der Einwirkung reduzierender Körper auf das Bilirubin erörtern. Hier noch ein paar Worte über die Deutung der äusserlich gleichartig verlaufenden Reaktion des Bilirubins auf salpetrige Säure und Haloide.

Wenn beide Oxydationsmittel nur oxydierend wirken würden, würde die Gleichartigkeit der Erscheinungen, die Umwandlung des Bilirubins in einen grünen, blauen, violetten, roten und schliesslich rot-

gelben Farbstoff, ohne Weiteres verständlich sein. Es lässt sich aber leicht zeigen, dass bei der Behandlung des Bilirubins mit Brom, Jod oder Chlor Haloidhaltige Körper resultieren, die allerdings ebenso gefärbt sind, wie die mit salpetriger Säure erhaltenen. Jedoch ist es ja möglich, dass neben der Haloidaufnahme auch noch eine Oxydation stattfindet. Zur Klärung dieser Frage habe ich das Verhalten des Bilirubins gegen Brom näher untersucht und gebe im folgenden Abschnitt das Ergebnis meiner Untersuchung im Vergleich mit den Angaben früherer Beobachter über die Wirkung der Haloide auf das Bilirubin wieder.

3. Einwirkung der Haloide auf das Bilirubin.

Als Erster hat wohl Thudichum[1] die Einwirkung der Haloide auf das Bilirubin genauer untersucht und gefunden, dass dabei Haloidhaltige Verbindungen des Bilirubins entstehen. Zumeist liess er auf trockenes Bilirubin Bromdämpfe haltige Luft, oder auf in Chloroform gelöstes Bilirubin Brom einwirken. Die bei dieser Einwirkung entstandenen grünen, blauen, violetten und roten Farbstoffe hielt er nicht für identisch mit den bei der Einwirkung der salpetrigen Säure auftretenden. Der grüne Farbstoff galt ihm als ein Gemenge des unveränderten Bilirubins mit dem blauen Farbstoff.

Da bei der Einwirkung von Brom auf Bilirubin Bromwasserstoff entweicht, nahm Thudichum an, dass

[1]) Liebig's Annalen Bd. 181 S. 242—261.
Manual of chemical Physiology London 1872 S. 78.

das Brom nicht oxydierend, sondern substituierend wirke.

Für den blauen Farbstoff fand er die allerdings hypothetische Formel

$$C_9 H_8 Br NO_2$$

für den violetten Farbstoff die Formel

$$C_9 H_7 Br_2 NO_2.$$

Ausserdem glaubte er noch zwei Körper dargestellt zu haben von der Formel

$C_9 H_8 Br NO \cdot C_9 H_9 NO_2$ = Hydrobrombilirubid·Bilirubin, durch Einwirkung von Bromwasserstoff auf Bilirubin, und $C_9 H_8 Br NO$ = Hydrobilirubid, aus ersterem durch Alkohol, Aether oder Schwefelsäure gewonnen.

Maly[1] der anfänglich geneigt war, in den mit Brom aus dem Bilirubin erhaltenen Farbstoffen Oxydationsprodukte zu erblicken, bestätigte[2] später die Thudichum'schen Angaben zum Teil und stellte auch einen blauen bromhaltigen Farbstoff dar, der in dünnen Schichten grün, in dicken schwarz war, sich in Alkohol mit blauer Farbe löste, unlöslich in Wasser war, von Ammoniak und Alkalien mit dunkelvioletter Farbe gelöst und durch letztere allmählich in einen grün gefärbten Körper umgewandelt wurde.

Beim Trocknen über 40° verlor der blaue Farbstoff Brom in Form von Bromwasserstoff. Die Analysen desselben ergaben sehr verschiedene Werte, und führte Maly die Schwankungen im Kohlenstoffgehalt zurück auf die Bildung sehr flüchtiger Bromkohlenwasserstoffverbindungen.

[1]) Wiener Sitzungsberichte Bd. 57 II S. 95.
[2]) Wiener Sitzungsberichte Bd. 59 S. 597.

Nachstehend die Analysenwerte Maly's.

	I.		II.		III.		IV.	V.	VI.	
H	4,15	4,14	4,26	4,19	—	—	4,70	4,16	—	%
Br	28,90	—	27,70	—	28,25	29,70	27,94	28,20	29,60	„
N	—	—	7,4	—	—	—	7,3	—	—	„
C	47,83	35,51	44,70	40,82	—	—	47,0	44,33	—	„

Berücksichtigt man zunächst nur die Analyse I. und IV, so ergiebt sich folgende mittlere Zusammensetzung des Körpers ($C_{22}H_{25}Br_2N_3O_4$) 47,41 % C, 4,42 % H, 28,42 % Br, 7,3 % N, 12,45 % O.

Maly hat offenbar für die Berechnung des Kohlenstoffs auch nur die Werte der Analysen I und IV verwertet, sonst aber andere Mittel gezogen. Nimmt man ausser für Kohlenstoff die Mittelzahlen aus allen Analysen, so kommt man zu folgender Zusammensetzung

$C_{22}H_{24}Br_2N_3O_4$

47,41 % C, 4,27 % H, 28,61 % Br, 7,35 % N, 12,36 % O,

jedenfalls aber in beiden Fällen fast zu der gleichen Formel $C_{22}H_{24\text{ od. }25}Br_2N_3O_4$. Da Maly fand, dass dieser blaue Farbstoff durch Reduktion in Hydrobilirubin, durch Alkalien in Biliverdin überging, so hat er offenbar für nötig gehalten die einfachste Formel für das Bilirubin zu verdreifachen; thut man dieses, so kommt man zu der Formel $C_{33}H_{36}Br_3N_4O_6$, während Maly für seinen blauen Farbstoff die Formel $C_{32}H_{33}Br_3N_4O_6$ aufstellt. Nachstehend gebe ich die für verschiedene Formeln berechneten Werte wieder in Gegenüberstellung der gefundenen:

	Gefunden	Berechnet für		
		$C_{32}H_{24}Br_2N_4O_4$	$C_{32}H_{26}Br_2N_4O_5$	$C_{32}H_{28}Br_2N_4O_6$
C	47,41 %	47,65 %	48,06 %	47,46 %
H	4,27 (4,42 %)	4,33 „	4,37 „	4,08 „
Br	28,61 (28,42 %)	28,88 „	29,13 „	29,66 „
N	7,35 %	7,58 „	6,79 „	6,92 „
O	12,36 (12,45 %)	11,56 „	11,65 „	11,88 „

Ich habe gleichfalls mehrmals versucht, die Körper, welche durch die Bromeinwirkung entstehen, zu isolieren, doch ist es mir nicht in wünschenswerter Weise gelungen. Nur den blauen Farbstoff konnte ich durch Fällen der alkoholischen Lösung mit Wasser in Form eines blauen, amorphen Niederschlages erhalten, der getrocknet und zerrieben ein blauviolettes Pulver lieferte. Dasselbe war in Wasser, Chloroform, Aether und Eisessig so gut wie unlöslich. Alkalien lösten es mit schmutzig grüner Farbe, die beim Ansäuern der Lösung wieder in blau überging. Zink und Salzsäure färbten die alkoholische blaue Lösung grün, ebenso färbte sich die alkoholische blaue Lösung schon beim Eindampfen grün, doch konnte in beiden Fällen durch Brom oder salpetrige Säure die blaue Farbe wieder hergestellt werden. Schwefelwasserstoff färbte ebenfalls die blaue Lösung intensiv grün und fällte dann grüne Flocken.

Die Elementaranalyse lieferte folgende Werte.

1. 0,3065 g Substanz = 0,6001 g CO_2 = 53,40 % C
   und 0,1878 g H_2O = 6,81 „ H
2. 0,3952 g Substanz = 0,7768 g CO_2 = 53,61 „ C
   und 0,2301 g H_2O = 6,47 „ H
3. 0,4132 g Substanz = 0,0226 g N = 5,47 „ N
4. 0,3234 g „ = 0,0181 g N = 5,60 „ N
5. 0,2684 g „ = 0,0987 g AgBr = 15,65 „ Br
6. 0,2636 g „ = 0,0960 g AgBr = 15,50 „ Br

und ist demnach die Formel für das blaue Bromprodukt $C_{23}H_{34}N_2BrO_6$

	gefunden	für $C_{23}H_{34}N_2BrO_6$ berechnet.
C	53,50 %	53,70 %
H	6,64 „	6,61 „
N	5,53 „	5,45 „
Br	15,57 „	15,56 „
O	18,76 „	18,68 „

Diese Formel passt auch nicht annähernd zu denjenigen von Thudichum und Maly. Vor allem unterscheidet sie sich durch den niedrigen Bromgehalt, der etwa nur halb so gross ist, wie der von Maly im blauen Farbstoff gefundene, sowie durch geringeren Gehalt an Stickstoff, aber grösseren an Wasserstoff und Sauerstoff. Ich glaube daher, dass der blaue Farbstoff überhaupt kein einheitlicher Körper ist, jedenfalls nicht ein einfaches Bromsubstitutionsprodukt des Bilirubins, und ebenso ist auch anzunehmen dass der violette und rote Farbstoff, die weitere Einwirkung von Brom auf Bilirubin hervorruft, nicht reine oder einfache Körper sind.

Als Endprodukt der Bromeinwirkung erhielt ich aus dem Bilirubin einen in Lösung rotgelb gefärbten Körper, der entstand, wenn Bilirubin mit überschüssigem Brom längere Zeit digeriert wurde. Aus der alkoholischen Lösung wird er durch Wasser flockig gefällt und liefert, getrocknet und zerrieben, ein braunrotes, aromatisch riechendes, amorphes Pulver.

Die Elementaranalyse desselben ergab folgende Werte.

1. 0,2720 g Substanz = 0,3836 g CO_2 = 38,46 % C
   und = 0,1692 g H_2O = 6,91 „ H
2. 0,3886 g Substanz = 0,5546 g CO_2 = 38,92 „ C
   und = 0,2301 g H_2O = 6,58 „ C
3. 0,2784 g Substanz = 0,0140 g N = 5,03 „ N
4. 0,3824 g „ = 0,0200 g N = 5,23 „ N
5. 0,1983 g „ = 0,2030 g AgBr = 43,57 „ Br
6. 0,2975 g „ = 0,3052 g AgBr = 43,65 „ Br

Die Zusammensetzung ist demnach $C_{18}H_{36}N_2O_2Br_3$.

Gefunden im Mittel		Berechnet auf $C_{18}H_{36}N_2O_2Br_3$
C	38,69 %	39,13 %
H	6,74 „	6,52 „
Br	43,61 „	43,48 „
N	5,13 „	5,07 „
O	5,83 „	5,80 „

Dieser Körper unterscheidet sich bedeutend von den oben besprochenen beiden bekannten bromhaltigen Abkömmlingen des Bilirubins und macht die Annahme noch wahrscheinlicher, dass die Bromprodukte des Bilirubins nicht einfache Substitutionsprodukte sind, sondern dass gleichzeitig mit der Bromierung eine mehr oder weniger starke Oxydation erfolgt.

Bei Annahme einer solchen würde die Uebereinstimmung der Wirkung der salpetrigen Säure und der Haloide verständlicher werden. Ich fasse die Befunde dieser Einwirkungen daher nachstehend noch einmal kurz zusammen: Es wurden bisher gefunden als

A. Produkte der Einwirkung der salpetrigen Säure

1. grün. Farbstoff (Biliverdin n. Thudichum) $C_{16}H_{18}N_2O_4$
   „ „ („ „ Maly) $C_{32}H_{33}(OH)_3N_4O_6$
2. gelber Körper (nach Köster) $C_9H_9NO_4$.

B. als Produkte der Einwirkung des Broms

1. blauer Farbstoff (nach Maly) $C_{32}H_{33}Br_3N_4O_6$
   „ „ („ Thudichum) $C_9H_8BrNO_2$
   „ „ („ Köster) $C_{23}H_{34}BrN_2O_6$
2. violetter „ („ Thudichum) $C_9H_7Br_2NO_2$
3. rotgelber „ („ Köster) $C_{18}H_{36}Br_3N_2O_2$.

Der Umstand, dass mehrere Produkte 9 Atome Kohlenstoff enthalten, dass weiter mein blaues Bromprodukt um 9 Atome Kohlenstoff ärmer ist, als die verdoppelte Bilirubinformel bietet, scheint mir die auf Seite 38 ausgesprochene Vermutung, dass im Bilirubin mehrere Kerne enthalten sind, noch mehr zu rechtfertigen.

Ich war nun in der glücklichen Lage die Art des einen Kerns wohl sicher ermitteln zu können, als ich Bilirubin der Zinkstaubdestillation unterwarf. Hierüber, sowie über die Versuche überhaupt, das Bilirubin zu reducieren, werde ich im folgenden Abschnitt berichten.

4. Einwirkung reducierender Mittel auf das Bilirubin.

Behandelt man eine alkalische Bilirubinlösung mit reducierenden Mitteln, z. B. Natriumamalgam, so sieht man die braunrote Flüssigkeit sich mehr und mehr entfärben. Beim Neutralisieren tritt dann keine Fällung ein. Dasselbe kann man beobachten, wenn man eine Biliverdinlösung in Alkohol mit Zink und Salzsäure behandelt. Es tritt also nicht ohne weiteres aus dem Biliverdin das eine Sauerstoffatom wieder aus und wird Bilirubin zurückgebildet.

Auch dieses lässt darauf schliessen, dass das Biliverdin kein einfaches Oxydationsprodukt ist.

Maly hat bei der Reduktion des Bilirubins bis zur bleibenden Aufhellung mit Natriumamalgam einen Körper erhalten, der durch Salzsäure aus der beim Ansäuern zunächst granatrot gefärbten Flüssigkeit ausfiel. Derselbe war unlöslich in Ammoniak, Alkalien, Alkohol und Chloroform, wenig löslich in Wasser und Aether; getrocknet war er braun mit grünem Reflex. Seine Zusammensetzung war im Mittel: 64.68 % C, 6,93 % H, 9,22 % N, 19,17 % O, entsprechend der Formel $C_{32}H_{40}N_4O_7$. Maly hielt diesen als Hydrobilirubin bezeichneten Körper für identisch mit dem Urobilin Jaffé's. Er will ihn auch durch Reduktion des blauen Tribrombilirubins erhalten haben. Versuche meinerseits, diese Reduktion vorzunehmen, hatten kein befriedigendes Ergebnis; ich erhielt weder direkt aus dem Bilirubin, noch indirekt aus dem blauen bromhaltigen Farbstoff Hydrobilirubin; dagegen erhielt ich höchst bemerkenswerte Produkte bei der Destillation des Bilirubins mit Zinkstaub. Zunächst führe ich hier die Beobachtungen bei dem Verlauf der Zinkstaubdestillation an.

Dieselbe wurde nach der üblichen Methode im schwer schmelzbaren Glasrohr im Wasserstoffstrom ausgeführt.

Die mit der dreifachen Menge Zinkstaub gemischte Substanz wurde anfangs schwach, schliesslich bis zur schwachen Rotglut erhitzt. Die Produkte der Destillation wurden in vier hintereinander geschalteten Reagenzgläsern aufgefangen, von denen das erste, leere

in einer Kältemischung stand, während das zweite mit Wasser, das dritte mit starker Schwefelsäure, das vierte mit Barytwasser beschickte in Eiswasser standen. Während der Destillation entwickelten sich gelbe Dämpfe, wie man sie auch bei der trockenen Destillation des Bilirubins beobachtet, die zum Teil schon in der Zuleitungsröhre, hauptsächlich aber in dem ersten Reagenzrohre sich zu rotbraunen öligen Tropfen verdichteten. Ausserdem setzte sich in dem ersten leeren Reagenzglase einiges Wasser ab. Gleichzeitig färbte sich die Schwefelsäure dunkelschwarzbraun. Aus der Barytlösung fiel allmählich ein weisser flockiger Niederschlag. Bei der Eröffnung der ersten Vorlage war ein intensiver Geruch nach Blausäure wahrzunehmen. Ebenso roch das Wasser in der zweiten Vorlage stark nach Blausäure. Die Gegenwart solcher wies ich durch die Silbernitrat- und Berliner Blau-Reaktion nach. Nach vorsichtiger Verdunstung der Blausäure roch der Inhalt der beiden Vorlagen intensiv nach Pyridin; er war in Alkohol und Aether leicht löslich. Mit Aether aufgenommen und durch Filtration vom mitgerissenen Zinkstaub, dann durch Verdampfen wieder vom Aether befreit, löste sich derselbe zum Teil in Wasser. In der stark nach Pyridin riechenden wässrigen Lösung erzeugte Phosphorwolframsäure einen schwach gelben, Bromwasser einen orangefarbenen Niederschlag. Platinchlorid fällte aus der angesäuerten Lösung einen braungelben Niederschlag, dessen Platingehalt ich bestimmte und zwar zweimal aus zu verschiedener Zeit aus dem Bilirubin erhaltenen Destillaten.

1. 0,0308 g Substanz gaben 0.0113 g Pt = 36,68 %
2. 0,0562 g „ „ 0,0204 g Pt = 36,29 „

Das Mittel dieser beiden Bestimmungen des Platingehaltes ist sonach 36,48 % Pt, während der für das reine Pyridin-Platin-Doppelsalz $C_{10}H_{10}N_2 \cdot 2HCl \cdot PtCl_4$ berechnete Wert für das Platin nur 34,21 % Pt beträgt. Doch ist die Differenz zwischen der gefundenen und berechneten Platinmenge, besonders in Anbetracht des Umstandes nicht so sehr gross, dass zur jedesmaligen Bestimmung des Platins nur wenige Centigramme Substanz verwandt werden konnten.

Die Schwefelsäure in der dritten Vorlage roch sehr stark nach Piperidin, ihre dunkle Färbung war vermutlich durch die Aufnahme von Kohlenwasserstoffen bedingt, und konnten solche auch noch durch den Geruch der aus der vierten Vorlage entweichenden Gase konstatiert werden. Auch brannte der entweichende Wasserstoff mit leuchtender Flamme. Der aus der Barytlösung gefällte weisse Niederschlag bestand aus kohlensaurem Baryum. Leider waren die aromatischen Produkte der Zinkstaubdestillation, selbst bei Verwendung grösserer Mengen Bilirubin (3 g), so gering, dass irgend welche weitere Reaktionen zur Sicherstellung der Natur derselben nicht gemacht werden konnten; der oben geführte Nachweis des bei der Zinkstaubdestillation aus dem Bilirubin enstandenen Pyridins erscheint mir jedoch einwandfrei. Ich nehme daher an, dass das Bilirubin einen Pyridinkern enthält und vermöge dessen das zweite Atom Stickstoff in festerer Bindung besitzt, als das erste, das vielleicht einer Amidogruppe angehört und bei der Zinkstaub-

destillation in Form von Cyanwasserstoff abgespalten wird. Auch durch schmelzendes Ätzkali kann dieses Atom Stickstoff aus dem Bilirubin in Form von Ammoniak entbunden werden, wie ein Versuch mir dargethan hat.

Dass im Tierkörper Substanzen mit Pyridinkern vorkommen, ist nicht mehr auffällig, nachdem die im Hundeharn vorkommende Kynurensäure als Oxychinolin-monocarbonsäure erkannt worden ist.

Bei der Durchsicht der Literaturangaben kam ich auch auf eine Notiz, die geeignet erscheint, meine Beobachtungen zu bestätigen.

M. Nencki und N. Sieber[1] geben in ihrer Mitteilung „Untersuchungen über den Blutfarbstoff" an, dass eine Häminlösung nach längerem Kochen mit Zink und Salzsäure vollständig entfärbt wurde und dabei flüchtige Produkte mit dem charakteristischen Pyridingeruch entstanden.

Nun hat man schon lange vermutet, dass der Blutfarbstoff das Bildungsmaterial für den Gallenfarbstoff ist oder doch wenigstens dem letzteren nahe verwandt ist. Hoppe-Seyler hatte bei Behandlung des Hämatins mit Zink und Salzsäure einen Urobilin-artigen Körper gefunden. Nencki und Sieber, welche diesen Befund bestätigen konnten, glauben, dass Hämatin durch Abspaltung von Eisen und unter Aufnahme von Wasser Bilirubin bilden könne.

$$\underset{\text{Hämatin}}{C_{32}H_{32}N_4O_4Fe} + 2\,H_2O - Fe = \underset{\text{Bilirubin}}{C_{32}H_{36}N_4O_6}$$

[1]) Berliner Berichte 1884 Bd. 17 S. 2267 u. folg.

Sie halten sich zu dieser Annahme deshalb berechtigt, da sie aus dem Hämatin Hydrobilirubin erhalten haben. Den Vorgang der Bildung von Hydrobilirubin erklären sie durch folgende Gleichungen.

$$C_{32}H_{30}N_4O_3Fe + 1H_2O + 2HCl = C_{32}H_{40}N_4O_7 + FeCl_2$$

Hämin — Hydrobilirubin

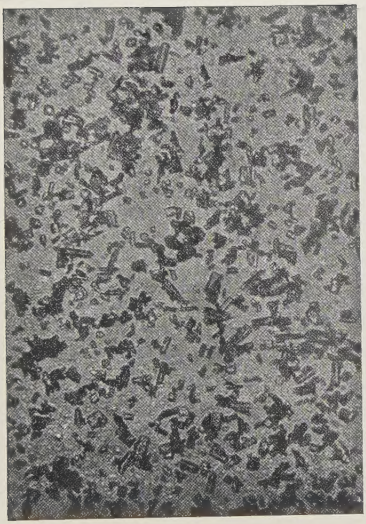
$$C_{32}H_{36}N_4O_6 + H_2O + 2H = C_{32}H_{40}N_4O_7$$

Bilirubin — Hydrobilirubin

Diese Beobachtungen von Nencki und Sieber gewinnen nun durch meinen Befund bedeutend an Wahrscheinlichkeit und würde die mutmassliche Verwandtschaft von Blutfarbstoff und Gallenfarbstoff wohl zur Gewissheit erhoben werden, wenn beide einen Pyridinkern enthalten würden. Natürlich muss dieser Pyridinkern im Bilirubin noch mit einer oder mehreren Atomgruppen verbunden sein, da das Bilirubin ein viel grösseres Molekül besitzt. Vielleicht ist es mit einem Benzolkern verbunden; einige Beobachtungen meinerseits deuten darauf hin. Bei der Verdunstung des Rückstandes der Behandlung des Bilirubins mit Kaliumpermanganat fand ich das Auftreten eines deutlichen Geruches nach Cumarin; bei der trocknen Destillation des Bilirubincalciums denjenigen von Benzaldehyd neben dem ausgesprochenen Pyridingeruch. Weitere diesbezügliche Untersuchungen konnte ich leider nicht mehr unternehmen, da ich bei der wiederholten Zinkstaubdestillation das letzte mir zu Gebote stehende Material verbraucht hatte, und die Beschaffung neuen Materials in absehbarer Zeit nicht möglich ist. Nur soviel will ich noch erwähnen, dass, wenn das Bilirubin einen Pyridinkern erhält, das Endprodukt der Einwirkung

der salpetrigen Säure auf Bilirubin ein Pyridinabkömmling bezw. eine alkylierte Pyridinkarbonsäure sein könnte, während die Biliverdinsäure Küster's ein Abkömmling des Benzolkerns sein müsste.

Weitere Forschungen werden hoffentlich Klarheit über diese Verhältnisse, insbesondere über das äusserlich so gleichartige Verhalten des Bilirubins gegen salpetrige Säure und Brom, bringen.

Als das Ergebnis meiner Arbeit möchte ich zum Schluss noch bezeichnen, dass es mir gelungen ist nachzuweisen, dass das Bilirubin thatsächlich die von Staedeler, Maly und Küster ermittelte Zusammensetzung hat, dass das Molekulargewicht 286 ist, und dass es normale Salze bildet; ferner dass das Biliverdin nicht als einheitlicher Körper gelten kann, und dass sehr wahrscheinlich die Einwirkung von salpetriger Säure und von Brom das Bilirubin zum Teil zerlegt, wenn auch bei letzterer zugleich Brom in das Spaltungsprodukt eintritt; endlich dass das Bilirubin bei der Zinkstaubdestillation Pyridin liefert, und darum als Pyridinderivat angesehen werden muss. Da nach Nencki und Sieber das Hämatin bei der Reduktion auch Pyridin liefert, dürfte die nahe Verwandtschaft des Blut- und Gallenfarbstoffes wohl nicht mehr zweifelhaft sein.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Professor Dr. Pfeiffer für die freundliche Unterstützung und die Überlassung des so kostbaren Materials meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.